Die spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen

1971

Hilmar Heutelbach

Aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Die spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hilmar Heutelbach

aus

München

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546015_0081

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B	GESCHICHTLICHES	2
C	DEFINITION DER EINHEITEN	4
	I Die biologische Kallikreineinheit	4
	II Die enzymatische Kallikreineinheit	4
	III Inhibitor Einheiten	5
D	EIGENSCHAFTEN DER KALLIKREINE	5
	I Vorkommen	5
	II Molekulargewichte der Kallikreine von Säugern	6
	III Kallikrein aus Niere und Harn	7
E	EXPERIMENTELLER TEIL	9
	I Die Bedeutung von Enzymbestimmungen im Harn und ihre Schwierigkeiten	9
	II Bestimmungsmethoden	11
	a) Die spektrophotometrische Methode nach I. Trautschold und E. Werle	11
	b) Die biologische Methode	13
	III Herstellung der Standardlösung	13
	a) aus Menschenharn	14
	b) aus Schweineharn	14
	IV Modifizierung der spektrophotometrischen Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen	15
	V Die modifizierte Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen	18

Seite

a) Dialyse der Harnproben 18
b) Durchführung der spektrophotometrischen Bestimmung 19
c) Berechnung 20
d) Automatische Aufzeichnung der Extinktionsänderung 22
e) Mitführen eines Standards 24

F ERGEBNISSE 25

I Ergebnisse der statistischen Überprüfung 25

II Schematische Arbeitsanleitung 30

III Besondere Beobachtungen 32

G DISKUSSION 35

H ZUSAMMENFASSUNG 43

I LITERATUR 44

A EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Zuverlässigkeit quantitativer Analysen ist heute unumgängliche Voraussetzung auf vielen Gebieten medizinischer Forschung. Um dieser Forderung gerecht werden zu können, sind häufig sehr aufwendige Vorrichtungen nötig, die nur in großen Laboratorien mit hochspezialisiertem Personal vorhanden sein können. Jedoch erlangen in der Medizin quantitative Bestimmungen zu diagnostischen Zwecken zusehends an Bedeutung. Es sind daher für das Routinelabor einfache und ebenso zuverlässige Methoden nötig. Hier haben sich besonders spektrophotometrische Methoden wegen ihrer verhältnismäßig einfachen Handhabung und ihrer großen Genauigkeit durchgesetzt.

Die Bestimmung des Harnkallikreins erfolgt bisher mit einer biologischen Methode, die jedoch zu Routinezwecken schwer anwendbar ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die von I. Trautschold und E. Werle entwickelte Methode zur Bestimmung BAEE-spaltender Enzyme auf ihre Verwendbarkeit zur Bestimmung des Harnkallikreingehaltes im menschlichen Harn zu überprüfen.

B GESCHICHTLICHES[9]

Bei seinen Untersuchungen über die reflektorische Anurie beobachtete E. K. Frey 1925 beim narkotisierten Hund durch intravenöse Harninjektionen eine charakteristische depressorische Wirkung von menschlichem und tierischem Harn. Er konnte so die Ergebnisse der Versuche von Abelous und Bardier, die jene 1908 durchgeführt hatten, bestätigen, wobei E. K. Frey eine Vergrößerung der Blutdruckamplitude feststellte.

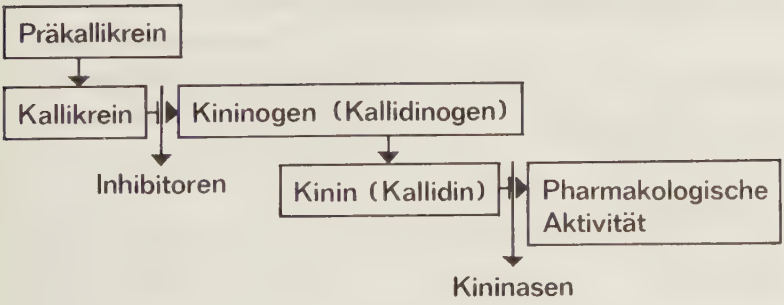
E. K. Frey und H. Kraut begannen 1925 mit der näheren Untersuchung dieses Effektes. Durch Essigsäurefällung konnten sie eine Substanz anreichern, die später Kallikrein genannt wurde und die nicht identisch ist mit anderen, beim Hund depressorisch wirkenden Substanzen, wie Histamin, Actylcholin und Adenylsäure. Außerdem entdeckten sie den "Kallikreininhibitor des Plasmas".

H. Kraut, E. K. Frey und E. Werle konnten in Widerkäuerorganen einen weiteren Inhibitor, der sich vom Plasmainhibitor durch geringere Thermolabilität, kleineres Molekulargewicht und größere Beständigkeit gegenüber pH-Verschiebungen unterscheidet, nachweisen.

Wegen des Vorhandenseins eines Inhibitors im Blut wurden größere Mengen inhibierten Kallikreins im Blut vermutet und nach der Bildungsstätte gesucht. Größere Mengen Kallikrein wurden im Pankreas gefunden, weshalb die Bezeichnung Kallikrein von dem griechischen Synonym für Pankreas Kallikreas abgeleitet wurde. 1955 stellten F. Werle, M. M. Forell und L. Maier fest, daß im Plasma Präkallikrein vorhanden ist und nicht wie ursprünglich angenommen, der Kallikrein-Inhibitor-Komplex.

1936 entdeckte F. Werle das pharmakologische Prinzip, welches zur Blutdrucksenkung bei intravenösen Kallikreininjektionen führt. Durch Inkubation von Serum mit Kallikrein wurde eine wesentlich größere Blutdrucksenkung erzielt, als der zugesetzten Menge Kallikrein entsprach. Gleichzeitig wurde eine darmkontrahierende Substanz gebildet, die den Namen Kallidin erhielt. Er hatte hiermit gezeigt, daß Kallikrein aus einer Vorstufe die eigentlich pharmakologisch wirksame Substanz freisetzt, aus Kallidinogen Kallidin, welches die depressorische Wirkung einer intravenösen Kallikreingabe verursacht. Später wurden weitere, dem Kallidin in ihrer Wirkung ähnliche Substanzen gefunden, die heute unter dem Begriff Kinine zusammengefaßt werden. Ihre Vorstufen heißen demnach Kininogene. Mit der Entdeckung des Kallidinogens und Kallidins bewies E. Werle, daß Kallikrein kein Hormon, wie ursprünglich angenommen, sondern ein Enzym ist.

Nachdem E. Werle die Kininasen entdeckt hatte, war der Wirkmechanismus des Kallikrein-Kinin-Systems erkannt, der im folgenden Schema veranschaulicht wird.



C DEFINITION DER EINHEITEN[9]

I. Die biologische Kallikreineinheit

"Eine biologische Kallikreineinheit (1KE) ist diejenige Menge Kallikrein, die bei i. v. Injektion am Carotisdruck eines narkotisierten Hundes dieselbe Senkung auslöst, wie 5 ml Harn von gesunden Menschen aus einer Sammelprobe von mindestens 50 l, die 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert worden war[8]. (Diese Einheit wird in der anglo-amerikanischen Literatur auch als 1 FU = Frey Unit bezeichnet.)"

II. Die enzymatische Kallikreineinheit

"Eine enzymatische Kallikreineinheit (1 eKE) ist diejenige Menge Kallikrein, die unter Standardbedingungen 1 µMol Benzoyl-arginin-äthylester pro Minute umsetzt"[26,29]. 1 eKE entspricht damit 1 IU (International Unit). Der 1000. Teil dieser Kallikreinmenge ist 1 meKE, b.z.w. 1 mU."

Die biologischen und enzymatischen Kallikreineinheiten sind nicht identisch. Für verschiedene Kallikreine ergeben sich unterschiedliche Umrechnungsfaktoren x, die in der folgenden Tabelle aufgezeigt sind.

Kallikrein aus:	x =
Schweinesubmandibularis	2,3
Schweinepankreas	1,0
Schweineserum	0,8
Schweineharn	2,3
Menschenharn	8,8

Die Umrechnung erfolgt nach der Formel:

$$mU = x \cdot KE$$

III. Inhibitor Einheiten

"Eine Einheit des Kallikrein-Trypsin Inhibitors (Trasylol ®) aus Rinderorganen (1 KIE) ist diejenige Menge Inhibitor, die unter Standardbedingungen (15 Min Inkubation bei pH 8,0 und 37° C) 2 KE aus Schweinepankreas zu 50 % hemmt. Es läßt sich auch eine enzymatische Inhibitor Einheit definieren als diejenige Inhibitormenge, die unter Standardbedingungen (15 Min Inkubation beim pH Optimum des Enzyms und bei Raumtemperatur) die Aktivität von 2 eKE zu 50 % hemmt, b.z.w. den Substratumsatz bei Standardbedingungen um 1 µMol/Min reduziert. Der 1000. Teil dieser Inhibitormenge ist eine Inhibitor-milli-Einheit (1 mIE)."

D EIGENSCHAFTEN DER KALLIKREINE

I. Vorkommen[9]

Das Vorkommen der Kallikreine wurde eingehender untersucht beim Menschen, bei Säugetieren und Vögeln (Ornitho-Kallikrein). Beim Menschen und den Säugetieren kommt das Enzym inaktiv als Vorstufe (Präkallikrein) in Magen, Darmschleimhaut, Pankreas und Blut, in aktiver Form (Kallikrein) in Mundspeicheldrüsen und Harn vor. Es bestehen Hinweise, daß Präkallikreine im Organismus noch weiter verbreitet sind.

Aktiver und inaktiver Kallikreingehalt der Kallikrein-bildenden Drüsen des Menschen:

Drüse	KE/g Frischgewicht
Gl. submandibularis[36,37,41]	1-2 aktiv
Gl. sublingualis[36,37,41]	1,4 aktiv
Parotis[41]	0,3 aktiv
Pankreas[16]	25 inaktiv

Aktiver und inaktiver Kallikreingehalt im Gastrointestinaltrakt, Kot und Blut beim Menschen:

	KE/gFrischgewicht	
	aktiv	inaktiv
Magenschleimhaut[37]	Spuren	1-15
Darmschleimhaut[37]	Spuren	1-15
Kot[33]	bis 20 Pankreaskallikrein	o

	KE/ml	
	aktiv	inaktiv
Mundspeichel[15,20,36]	0-6 durchschn. 1,7	0
Serum[6,7,33,37,40]	0	3-4
Blutkörperchen[9]	0	0

In Carcinoid Tumoren konnte eine den Kallikreinen eindeutig zuzuordnende Kininogenase gefunden werden. Solche Tumoren enthalten bis zu 500 KE/g Frischgewebe[18,21,39].

II. Molekulargewichte der Kallikreine von Säugern:

Kallikrein aus	Molekulargewicht
Pankreas Schwein[10,27]	ca. 33000 - 35000
Pankreas Mensch[19]	31 200
Submandibularis[22] Schwein	32 800
Serum Schwein[11]	97 000
Serum Mensch[9]	97 000
Harn Schwein[22]	36 300
Harn Mensch[19]	40 000

III. Kallikrein aus Niere und Harn[9]

Die Eigenschaften des Harnkallikreins des Menschen sind hier von besonderem Interesse. Die tägliche Kallikreinausscheidung unterliegt großen Schwankungen. Als im Normalwertbereich liegend ist eine Tagesausscheidung von 120 KE bis 320 KE anzusehen. In 1 ml Harn werden im allgemeinen 0,15 bis 0,25 KE/ml gefunden[17].

Als Bildungsort des Harnkallikreins wird die Niere angesehen. Würde es aus anderen Organen stammen, müßte es auf dem Blutwege in die Niere gelangen, jedoch ist im Blut nur Präkallikrein nachweisbar (15 000 - 20 000 KE im Gesamtblut). Allerdings entspricht eine Tagesausscheidung von ca 200 KE nur etwa 1 % des im Gesamtblut vorhandenen Kallikreins. Diese prozentuell geringe Menge könnte sich möglicherweise bei der Suche nach aktivem Kallikrein im Serum dem Nachweis entziehen.

R. Vogel demonstrierte, daß subkutane Gaben von 50 KE Pankreaskallikrein die Kallikreinausscheidung bei Ratten nicht erhöhte, was wahrscheinlich wäre, wenn im Blut befindliches Kallikrein in der Niere ausgeschieden würde. Ebensowenig scheiden Patienten mit akuter Pankreatitis, bei der Kallikrein ins Serum übertritt, vermehrt Kallikrein aus[9]. Auch eine Infusion von 100 Einheiten Pankreaskallikrein (Padutin ®) beim Menschen führte zu keiner Erhöhung der Harnkallikreinausscheidung[34].

Außerdem unterscheidet sich Harnkallikrein in seiner chemischen Zusammensetzung und im Molekulargewicht (siehe Tabelle) von anderen Kallikreinen.

Andere Befunde lassen genauere Rückschlüsse auf den Ort der Kallikreinsynthese in der Niere zu.

E. Werle und R. Vogel[40] konnten bei Ratten durch Verabreichung von Salyrgan, Uranylacetat oder Spermin eine selektive Schädigung der proximalen Nierentubuli hervorrufen, die zu einem Absinken der Harnkallikreinausscheidung führte. Ebenso werden nach Homo- und Heterotransplantationen der Niere durch Abwehrreaktionen des Empfängerorganismus die Tubuli der Niere zerstört. E. Werle, R. Busse und A. Schmal[34,35] konnten zeigen, daß nach Nierentransplantationen bei Hunden, als auch bei Menschen ein starkes Absinken der Kallikreinausscheidung bis zu beinahe völligem Verschwinden des Kallikreins im Harn erfolgt. Die Autoren konnten nachweisen, daß dieser Effekt die frühzeitige Erkennung einer Abstoßungskrise ermöglicht, zu einem Zeitpunkt, an dem die Nierenfunktion noch als normal zu betrachten ist.

Diese Befunde lassen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf eine Bildung des Kallikreins im proximalen Tubulusepithel der Niere schließen, zumindest aber auf eine Ausscheidung durch dieses.

E EXPERIMENTELLER TEIL

I. Die Bedeutung von Enzymbestimmungen im Harn und ihre Schwierigkeiten

Wohlgemuth[42] verwies zu Beginn dieses Jahrhunderts erstmals auf die diagnostische Bedeutung eines Enzyms im menschlichen Harn, die Veränderung der Amylaseausscheidung als Ausdruck eines pathologischen Geschehens im Gastrointestinaltrakt. Vierzig Jahre später wurde von Boyland et al.[2,3] auf die Bedeutung von Sulphatase und ß-Glucuronidase im Harn bei Blasencarcinomen aufmerksam gemacht. Obwohl also Veränderungen von Enzymkonzentrationen im Harn von diagnostischer Wichtigkeit sind, haben Enzymbestimmungen im Harn heute eine wesentlich geringere Bedeutung als Enzymbestimmungen im Serum. Was sind die Gründe hierfür ?

Die Konzentrationen der Serumbestandteile ändern sich nur langsam und deshalb erlauben Bestimmungen von Enzymkonzentrationen im Serum zuverlässigere Rückschlüsse auf das pathologische Geschehen zum Zeitpunkt der Blutabnahme. Der pH-Wert des Serums ist immer nahezu konstant (pH 7,38).

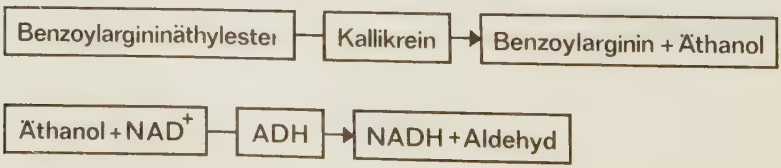
Im Harn ändern sich dagegen die Konzentrationen beständig, indem sich die Diurese ändert, oder auch Elektrolyte und andere Bestandteile des Harns, wie Harnstoff in unterschiedlicher Menge ausgeschieden werden. Eine besondere Schwierigkeit ist darin zu sehen, daß im Harn große pH Schwankungen auftreten können (pH 4,7 - 8,0), die die Aktivität von Enzymen sehr stark, mitunter irreversibel beeinflussen können. Außerdem kommen Inhibitoren für verschiedene Enzyme vor. Solche Inhibitoren können allerdings auch die Bestimmung von Enzymaktivitäten im Serum behindern. So vermag Harnstoff Laktatdehydrogenase zu hemmen[42].

Bei der Frage, ob es sinnvoll ist, Kallikrein im Harn spektrophotometrisch zu bestimmen, ist es nötig, diese Gedanken zu berücksichtigen.

Aus der Kallikreinkonzentration im Harn allein können niemals Rückschlüsse auf eine veränderte Nierenfunktion gezogen werden. Dies ist nur möglich, wenn die 24h Ausscheidung bestimmt wird. Um etwaige Verfälschungen der Bestimmung durch hohe Elektrolyt- und Harnstoffkonzentrationen auszuschalten, muß die zu untersuchende Harnprobe dialysiert werden. Hierdurch erhält außerdem das Untersuchungsmaterial einen annähernd konstanten pH-Wert, nämlich den von destilliertem Wasser. Das Kallikreinmolekül hat sich als stabil erwiesen gegenüber pH-Änderungen im physiologischen Bereich. Wäre dies nicht der Fall, so wäre auch eine biologische Bestimmung des Harnkallikreins nicht möglich. Kallikrein zeichnet sich außerdem dadurch aus, daß sich seine Konzentration im Harn über längere Zeit nicht verändert, vorausgesetzt, daß ein bakterieller Abbau verhindert wird. Als Richtwerte mögen folgende Zahlen gelten (durch eigene Versuche festgestellt):

Im Nativharn bei:	Zimmertemperatur	einige Tage
	-4^{o} C	1 Monat
	-18^{o} C	länger als 1/2 Jahr

Soll der Versuch gemacht werden Kallikrein spektrophotometrisch im Harn zu bestimmen, muß eine Methode verwendet werden, mit der reine Kallikreinlösungen zuverlässig bestimmt werden können. Eine solche Methode wurde von I. Trautschold und E. Werle[28] erarbeitet. Bei dieser Methode wird die Spaltungsgeschwindigkeit von N$^{\alpha}$ Benzoyl-L-arginin-äthylester gemessen nach den Reaktionsgleichungen:



Nun ist Harn keine reine Kallikreinlösung. Es liegen keine eindeutigen Befunde vor, daß im Harn nicht auch andere Esterasen, wie Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin vorkommen. Außerdem könnten auch unbekannte Esterasen vorhanden sein. Ebenso ist es denkbar, daß sich verschiedene Metaboliten störend auswirken. Da die Methode auch in der Klinik verwendbar sein soll, dürfen Medikamente und deren Abbauprodukte die Ergebnisse nicht verfälschen. Es zeigen sich also viele Fehlermöglichkeiten.

Die Frage der Anwendbarkeit dieser Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins kann nur geklärt werden, wenn anhand einer größeren Anzahl von Personen spektrophotometrisch Kallikreinbestimmungen durchgeführt werden, und die erhaltenen Werte im Doppelblindversuch mit der biologischen Methode verglichen werden, die bis auf wenige Einschränkungen zuverlässige Ergebnisse liefert.

II. Bestimmungsmethoden

a. Die spektrophotometrische Methode nach I. Trautschold und E. Werle[28]

Reagenzien:

Nikotin-amid-adenin-dinukleotid (NAD^+)

(Boehringer Mannheim)

In je 1 ml H_2O bidest. 20 mg NAD^+ lösen

N^{α} Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE)

(Merck)

In je 1 ml H_2O bidest. 1 mg BAEE lösen

Alkoholdehydrogenase (ADH Kristallsuspension)

1 Ampulle zu 3,4 ml enthält 100 mg

(Boehringer Mannheim)

Pyrophosphatpuffer pH 8,7

Herstellung des Pyrophosphatpuffers:

15,2 g Natriumpyrophosphat

4,1 g Semicarbacid

0,9 g Glycin in 400 ml H_2O bidest. lösen, mit 2n NaOH auf pH 8,7 einstellen und auf 500 ml auffüllen.

Ausführung:

Es werden nacheinander in die Meßküvette pipettiert:

0,02 ml ADH Kristallsuspension

0,1 ml NAD^+ Lösung

0,5 ml BAEE Lösung

Die Mischung 5 Min inkubieren bei 25° C

Danach wird die Kallikreinlösung der inkubierten Lösung zugesetzt. Das nun zuzusetzende Volumen des auf 25° C erwärmten Puffers wird so gehalten, daß das Endvolumen in der Küvette 3 ml beträgt. Nach weiteren 2 Min Inkubationszeit wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm gegen einen Leerwert ohne Kallikrein gemessen. Die zweite Messung der Extinktion erfolgt nach 10 Min.

Bei einer Schichtlänge der Küvette von 1 cm und einem Endvolumen von 3 ml entspricht eine Extinktionsänderung von 0,0011 ΔE/Min einer enzymatischen Aktivität von 1 mU.

Beispiel: Wurden 0,2 ml Kallikreinlösung eingesetzt, so befinden sich in dieser Lösung bei einem ΔE von 0,011/10 Min 5 mU/ml.

b. Die biologische Methode[9]

"Bei der biologischen Methode dient als Maß die Änderung des Blutdruckes im großen Kreislauf nach i. v. Injektion der Probelösungen. Die Bestimmung wird am besten beim künstlich beatmeten, atropinisierten Hund in Pernocton- oder Barbital-Narkose ausgeführt. Der Carotisdruck wird fortlaufend registriert. Die Wirkung der injizierten Probe wird mit einer Standardlösung verglichen, die aus Menschen- oder Schweineharn gewonnen wird und so eingestellt wird, daß der Kallikreingehalt 1 KE/ml (entsprechend der Definition der Kallikreineinheit) entspricht. Als Versuchstier wurde der Hund gewählt, weil er gut auf Kallikrein anspricht, dagegen auf Renin und Histamin schwächer als andere Säuger, wie Katze und Meerschweinchen. Das Verfahren eignet sich gut zur Harn- und Plasmakallikreinbestimmung, da die Versuchstiere bei Injektion kleiner Kallikreinmengen (0,01 - 0,03 KE/Kg) und bei genügenden Pausen zwischen den Injektionen (3 - 5 Min) während mehreren Stunden gleichmäßig reagieren. Die untere Grenze der Ansprechbarkeit liegt bei 0,005 - 0,002 KE je Kg Tier."

III. Herstellung der Standardlösung[9]

Die Standardlösung kann entweder aus Menschen- oder aus Schweineharn hergestellt werden.

a. Aus Menschenharn[19,30]

"Nach Dialyse wird der Harn bei pH 4,0 über eine Säule von XE-64 Cellulose gegeben, und das Kallikrein durch Phosphatpuffer bei pH 6,0 eluiert. Nach Chromatographie an DEAE-Cellulose bei pH 6,7 wird mit Phosphatpuffer von pH 6,3 eluiert, dialysiert und erst mit Aceton, dann mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Anschließend wird über Sephadex G-75 und schließlich über DEAE-Sephadex A-50 chromatographiert. Reinheitsgrad 2,3 µg/KE, Ausbeute 6 %."

b. Aus Schweineharn[22,38]

"10 l frischer Schweineharn (der Blase nach der Schlachtung entnommen) werden mit 10 l Aceton gefällt und dem Überstand nach Abtrennung der Fällung weitere 10 l Aceton zugesetzt. Der erneut gebildete Niederschlag wird isoliert, in 100 - 150 ml Wasser aufgenommen, vom Unlöslichen abzentrifugiert und der Rückstand nochmals mit 50 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Lösungen werden mit dem doppelten Volumen Aceton gefällt und das Zentrifugat mit 40, dann mit 20 ml Wasser eluiert. Man erhält ein Eluat mit etwa 270 KE/ml. Der Reinheitsgrad ist 50 - 80 µg Protein /KE. Die Lösung wird durch Filtration über Sephadex G-75, dann über G-100 weiter gereinigt. Der farblose Vorlauf enthält etwa 10 % des aufgetragenen Kallikreins mit 10 - 20 µg Protein/KE. Weitere 40 % fallen als farbloses Produkt vom Reinheitsgrad 10 µg/KE an, während die restlichen 50 % noch gefärbt sind und über Sephadex G-75 und G-100 rechromatographiert werden müssen. Wiederholte Adsorbtion an DEAE-Cellulose, mehrfache Säulenchromatographie an Sephadex G-75 und zweimalige Säulenelektrophorese an äthanolisierter Cellulose führen zu Präparaten mit einem Reinheitsgrad von 1,5 µg/KE."

IV. Modifizierung der spektrophotometrischen Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen

Es ist bekannt, daß die Genauigkeit der spektrophotometrischen Methode erhöht werden kann, wenn bei der Bestimmung des Kallikreingehaltes von Rohprodukten (in diesem Fall menschlicher Harn) als Leerwert eine parallele Bestimmung nach Zugabe eines Kallikrein-Inhibitors zum Rohprodukt erfolgt. Es können so Faktoren, die das Meßergebnis beeinflussen, genau von der reinen enzymatischen Aktivität des Kallikreins unterschieden werden. Aus diesem Grunde wurde zur spektrophotometrischen Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen der Kallikreininhibitor aus Rinderorganen Trasylol (R) gewählt.

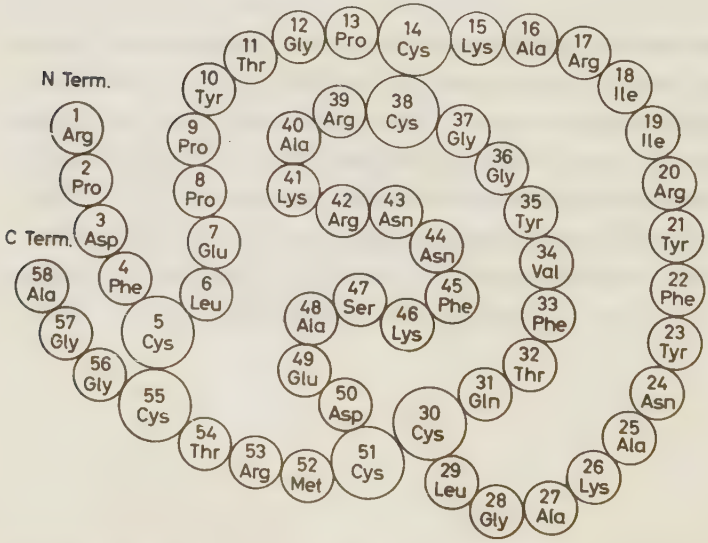
Trasylol zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus[32]: Es besitzt das breiteste Hemmspektrum aller bisher aus tierischem und pflanzlichem Material isolierten Inhibitoren. Es vermag außer Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin vor allem die für die Kininfreisetzung verantwortlichen Kallikreine zu hemmen.

Trasylol ist gegenüber einem proteolytischen Abbau sehr resistent, was sehr wahrscheinlich durch seine kompakte Tertiärstruktur bedingt ist.

Die Hemmung der proteolytischen, esterolytischen und kininliberierenden Aktivität der Enzyme ist dadurch bedingt, daß sich der "Hemmbezirk" des Inhibitormoleküls an das aktive Zentrum des Enzyms anlagert. Es wird ein inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex im Molverhältnis 1:1 gebildet. Die Dissotiationskonstante ist für den Kallikrein-Inhibitor-Komplex sehr klein, 10^{-8} M/l bei einem pH von 7,4. Die Einstellung des Hemmgleichgewichts erfolgt schnell und ist meist in Sekunden beendet. Liegen Enzym und Inhibitor in gleicher Menge vor, so ist dieser Vorgang in maximal 5 Min beendet[36].

Die Affinität des Inhibitors zum Enzym ist normalerweise sehr viel größer als die Affinität des Enzyms zum Substrat, in diesem Fall BAEE, um mindestens den Faktor 1 000.

Um durch die Zugabe der Trasylollösung eine möglichst geringe Verdünnung des zu untersuchenden Materials zu verursachen, wurde die am höchsten konzentrierte, im Handel befindliche Trasylollösung gewählt (100 000 KIE/10 ml). Es wurde 1 ml Harn mit 0,01 ml Trasylol versetzt. Demnach sind also in 1 ml Harn 100 KIE Trasylol gelöst. Diese Konzentration ist mit Sicherheit ausreichend, physiologisch vorkommende Kallikreinkonzentrationen im Harn optimal zu hemmen. Es muß darauf hingewiesen werden, daß Trasylol wie bereits erwähnt, außer Kallikrein auch Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin hemmt und deshalb eine Harnkallikreinbestimmung bei Anwendung von Trasylol nur dann richtig sein kann, wenn außer Kallikrein diese Enzyme im Harn nicht ausgeschieden werden. Diese Frage kann durch eine gleichzeitige Bestimmung der Harnproben im Doppelblindversuch mit der biologischen Methode anhand eines breiten Patientengutes überprüft werden.



Primärstruktur des Trasylol-Moleküls nach Laskowski und Anderer

Bei den ersten Messungen, die in der oben beschriebenen Weise durchgeführt wurden, und bei denen 0,2 ml undialysierter Harn ohne Trasylol zur Bestimmung des Meßwertes und 0,2 ml undialysierter Harn mit Trasylol zur Bestimmung des Leerwertes als Analysenvolumen in die Küvetten eingesetzt wurden, ergab sich bereits eine konstante Beziehung zwischen der spektrophotometrischen und der biologischen Methode. Jedoch waren die Differenzen zwischen Leerwert und Meßwert zu klein, um auch niedrige Kallikreinkonzentrationen exakt bestimmen zu können. Dies machte folgende Änderungen nötig:

1. Die in den Küvetten zu verwendende Harnkonzentration mußte verdoppelt werden.

2. Die Schichtlänge der Küvetten wurde vervierfacht auf 4 cm.

3. Die beiden oben genannten Maßnahmen setzen ein möglichst reines Untersuchungsmaterial voraus. Eine Dialyse der Harnproben ist somit unerläßlich. Außerdem wäre bei Verwendung von Küvetten mit 4 cm Schichtlänge die Extinktion des Leerwertes sehr hoch, da sich im Harn ein Metabolit fand, der mit ADH und NAD^+ eine Reaktion eingeht. Dieser Metabolit wird durch Dialyse weitgehend eliminiert und kann dann die Messung nicht mehr verfälschen. Auf Eigentümlichkeiten dieses Metaboliten soll später, im Zusammenhang mit den Harnen von Nierentransplantierten eingegangen werden.

4. Das größere Küvettenvolumen bedingt eine Vergrößerung des Endvolumens um das Dreifache, so daß jetzt die Methode in folgender Weise durchgeführt wird:

V. Die modifizierte spektrophotometrische Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen

a. Dialyse der Harnproben

10 ml Harn werden 8 - 12 h in mindestens 1 l destilliertem Wasser in einem porenlosen Cellophan-Dialysierschlauch (Trockenflachbreite ca 25 mm, Hersteller Kalle AG), der impermeabel ist für Moleküle mit einem größeren Molekulargewicht als 20 000 dialysiert. Für jede Harnprobe wird ein Dialysierschlauch von exakt 15 cm Länge verwendet, um den Fehler, der durch die Benetzung des Dialysierschlauches mit Harn auftritt, für alle Proben konstant zu halten.

Geladene Teilchen, z. B. Elektrolyte, führen zu einem Membranpotential an der Dialysiermembran, welches die Dialyse behindert. Durch einen Rührer wird dieses verhindert und gleichzeitig der Konzentrationsgradient zwischen Innen- und Außendialysat aufrecht erhalten. Während der Dialyse ändert sich aus osmotischen Gründen, sowie durch Änderung des Druckes im Dialysierbeutel das Volumen des Dialysates. Dies muß später bei der Berechnung der Kallikreinkonzentration berücksichtigt werden. Es werden daher konstant 10 ml Harn dialysiert und das Volumen nach der Dialyse in einem Meßzylinder bestimmt.

Das Dialysat ist trübe,da durch Änderungen des pH-Wertes Kristalle ausfallen. Es wird deshalb bei ca. 5 000 U/min klarzentrifugiert, um den Tyndalleffekt, der bei der Extinktionsmessung stören würde, zu verhindern.

b. Durchführung der spektrophotometrischen Bestimmung

Reagenzien und Herstellung des Pyrophosphatpuffers (pH 8,7), sowie der NAD^+- und BAEE-Lösungen siehe oben!

Zusätzlich: Trasylol® (Bayer, Leverkusen)

1 Ampulle enthält: 100 000 KIE/10 ml.

In je zwei Küvetten, Schichtlänge 4 cm werden pipettiert:

6	ml	Pyrophosphatpuffer
0,06	ml	ADH Kristallsuspension
1,5	ml	BAEE-Lösung
0,3	ml	NAD^+-Lösung

Zu 2 ml Dialysat werden 0,02 ml Trasylol zugesetzt und gut vermischt. Dies soll ca 5 Min vor Zugabe zum Reaktionsgemisch geschehen. Anschließend werden

Zu Küvette I	Zu Küvette II
1,2 ml Dialysat ohne Trasylol	1,2 ml Dialysat mit Trasylol

pipettiert und der Küvetteninhalt gut vermischt.

Das Endvolumen in jeder Küvette beträgt nun insgesamt 9,06 ml.

Nach weiteren 2 Min Inkubationszeit wird die Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm während 10 Min gemessen.

Die Extinktionsänderung der Küvette I während 10 Min ergibt den Meßwert ΔEM.

Die Extinktionsänderung der Küvette II während 10 Min ergibt den Leerwert ΔEO.

c. Berechnung

Die Größe der Differenz aus Meßwert ΔEM und Leerwert ΔEO ist von der Harnkallikreinkonzentration abhängig. Nun bedarf der Wert für ΔEO allerdings noch einer Korrektur, denn je ml Dialysat wurden 0,01 ml Trasylol zugesetzt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1 %. Der Wert ΔEO wird daher mit 0,01 multipliziert, um diesen Fehler zu korrigieren.

Die weitere Berechnung erfolgt unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ε , der der Extinktion (bei der entsprechenden Wellenlänge, pro cm Schichtlänge) entspricht, die eine Lösung des Produktes (in diesem Fall NADH) mit einer Konzentration von 1 Mol/l besitzt.

Als Berechnungsgrundlage dient folgende Formel:

$$\text{Aktivität} \triangleq \Delta E/\text{Min} \cdot \frac{10^6 \cdot EV}{\varepsilon \cdot d \cdot AV} \left[\frac{mU}{ml}\right]$$

Es ist:

ΔE/Min : $\frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1{,}01)}{10}$

EV das Endvolumen : 9,06 [ml]

AV das Analysenvolumen : 1,2 [ml]

d die Schichtlänge der Küvetten : 4 [cm]

ε für NADH bei Hg 366 nm : $3{,}30 \cdot 10^3 \left[l\ Mol^{-1}\ cm^{-1}\right]$

Diese Größen eingesetzt in die Formel ergibt sich für die Kallikreinaktivität:

$$\text{Aktivität} \triangleq \frac{\Delta \text{ EM} - (\Delta \text{ EO} \cdot 1{,}01)}{10} \times \frac{10^6 \cdot 9{,}06}{3{,}30 \cdot 10^3 \cdot 4 \cdot 1{,}2} \quad \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}}\right]$$

$$\triangleq \Delta \text{ EM} - (\Delta \text{ EO} \cdot 1{,}01) \cdot 57{,}196969 \quad \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}}\right]$$

Während der Dialyse wird aus oben beschriebenen Gründen die Kallikreinkonzentration im Dialysat verändert. Dies muß bei der Berechnung der Kallikreinkonzentration im Harn berücksichtigt werden.

Da der Einfachheit halber konstant 10 ml Harn dialysiert werden, ist diejenige Menge Kallikrein, die vor der Dialyse in 10 ml Harn (Volumen vor der Dialyse Vol. v. D.) nach der Dialyse in Vol. n. D. ml Dialysat enthalten (Volumen nach der Dialyse = Vol. n. D.).

Die Größe Vol. n. D. wird mit einem Meßzylinder bestimmt. Die Kallikreinaktivität KD im Dialysat ergibt sich aus der spektrophotometrischen Bestimmung. Unbekannt ist die Kallikreinaktivität KH im Harn.

Es gilt: $$KH = \frac{\text{Vol. n. D.}}{\text{Vol. v. D.}}$$

Da Vol. v. D. = 10 ml :

$$KH = \frac{\text{Vol. n. D.}}{10}$$

oder: Kallikreinaktivität im Harn $\triangleq$

$$\Delta \text{ EM} - (\Delta \text{ EO} \cdot 1{,}01) \cdot 5{,}72 \cdot \text{Vol. n. D.} \quad \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}}\right]$$

gemessen bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm.

Es ist möglich, die Messungen bei einer Wellenlänge von Hg 334 nm durchzuführen. Da bei dieser Wellenlänge ein anderer molarer Extinktionskoeffizient

$$\varepsilon = 6{,}0 \cdot 10^3 \left[1 \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right]$$

Gültigkeit hat, wird die Kallikreinaktivität im Harn nach folgender veränderten Formel berechnet:

$$\Delta \text{ EM} - (\Delta \text{ E O} \cdot 1{,}01) \cdot 3{,}15 \cdot \text{Vol. n. D.} \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

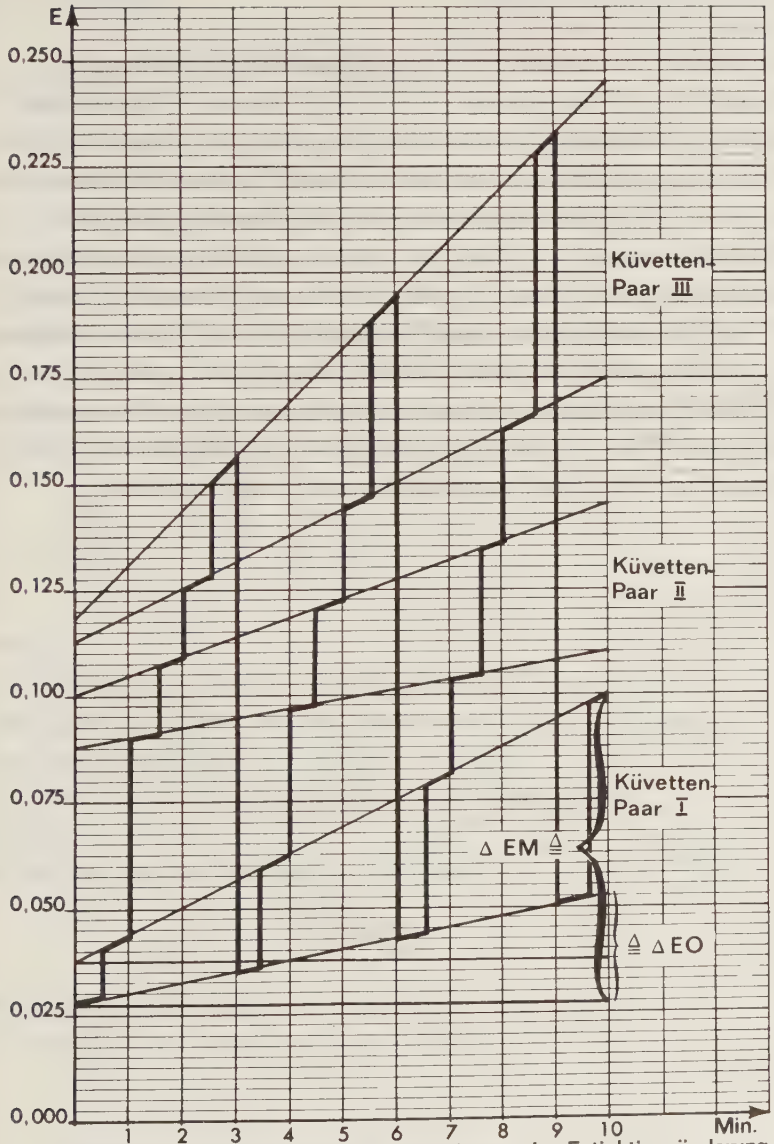
d. Automatische Aufzeichnung der Extinktionsänderung

Als Zusatzgerät zum Photometer kann ein Enzymtestauswerter verwendet werden, der die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit graphisch registriert. Wenn gleichzeitig ein Küvettenwechselautomat Anwendung findet, ist es möglich, die Messung der Extinktionsänderung von sechs Enzymansätzen gleichzeitig durchzuführen. Die Küvetten werden in bestimmten Zeitabständen automatisch in den Lichtweg des Photometers geschaltet und die jeweilige Extinktion vom Enzymtestauswerter aufgezeichnet. Da bei der spektrophotometrischen Bestimmung des Harnkallikreins jeweils zwei Küvetten einer Bestimmung entsprechen, kann also gleichzeitig der Kallikreingehalt von drei Harnproben bestimmt werden.

Das nachfolgende Diagramm zeigt eine solche Bestimmung. In der Abszisse ist die Zeit T in Minuten aufgetragen, in der Ordinate die Extinktion. Bei T = 10 Min., kann die Extinktionsänderung in mm abgelesen werden.
Für diese Darstellung gilt:

$$8 \text{ mm} = \Delta \text{ E } 0{,}01$$

Mit Hilfe dieser Beziehung kann die Größe der Extinktionen und damit die Kallikreinaktivität im Harn errechnet werden.



Beispiel einer automatischen Aufzeichnung der Extinktionsänderung von 6 Enzymansätzen mittels eines Enzymtestauswerters und Küvettenwechselautomaten.

e. Mitführen eines Standards

Es erscheint wünschenswert bei spektrophotometrischen Methoden einen Standard mitzuführen. Da jedoch die Aktivität von Enzymen über einen längeren Zeitraum Veränderungen unterliegen kann, sind sie zu Eichzwecken nur beschränkt verwendbar. Kallikrein ist als Padutin® (Hersteller: Bayer) in trockener, sowie gelöster Form im Handel. Es ist zur Herstellung einer Standardlösung jedoch nicht verwendbar, weil es nicht rein genug ist. Da bei der spektrophotometrischen Methode die Produktenzunahme gemessen wird, die unter Standardbedingungen immer den Konzentrationen im Untersuchungsmaterial proportional ist, ist es ohnehin nicht unbedingt erforderlich, einen Standard mitzuführen. Es ist jedoch ratsam, stichprobenartig Doppelbestimmungen durchzuführen oder aber eine Harnprobe mit bereits bekanntem Kallikreingehalt bei jeder Meßreihe als Kontrollwert zu bestimmen.

F ERGEBNISSE

I. Ergebnisse der statistischen Überprüfung[14,23]

Nachdem die spektrophotometrische Methode von I. Trautschold und E. Werle[28] wie im experimentellen Teil beschrieben, modifiziert worden war, wurde die Frage der Anwendbarkeit zur Bestimmung der Kallikreinaktivität im menschlichen Harn überprüft, indem im Doppelblindversuch die Harne eines breiten Patientengutes spektrophotometrisch und biologisch auf ihren Kallikreingehalt untersucht wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Meßergebnisse von insgesamt 143 untersuchten Harnproben wurden einander gegenübergestellt und ihre Korrelation durch Errechnen des Bravais-Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r überprüft nach folgender Formel[23]:

$$r = \frac{\Sigma \cdot (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2 \cdot \Sigma (y - \bar{y})^2}}$$

Wobei

x der Größe eines biologischen Meßergebnisses entspricht,

y der Größe eines spektrophotometrischen Meßergebnisses entspricht, und

$\bar{x}$ das arithmetische Mittel aller biologischen Werte,

$\bar{y}$ das arithmetische Mittel aller spektrophotometrischen Werte ist.

Für den Korrelationskoeffizienten ergab sich:

$$r = 0{,}9655$$

Damit sind die Ergebnisse, zu denen die biologische und die spektrophotometrische Methode führten, hoch positiv korreliert.

Zur weiteren Verdeutlichung der engen Beziehung zwischen den Ergebnissen der biologischen und spektrophotometrischen Methode wurden diese im nachfolgenden Streuungsdiagramm eingetragen und der Verlauf der Regressionsgeraden rechnerisch festgelegt mit Hilfe der folgenden Normalgleichungen:

$$\Sigma y = n \cdot a \cdot b \cdot \Sigma x$$
$$\Sigma xy = a \cdot \Sigma x + b \cdot \Sigma x^2$$

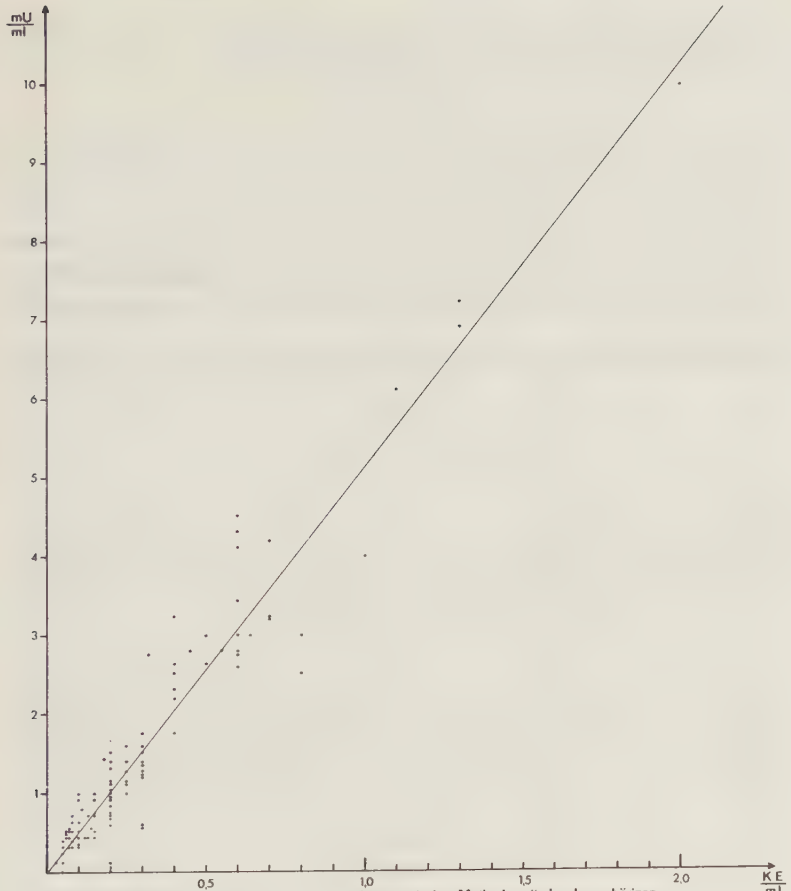
In diesen Gleichungen sind a und b die unbekannten Parameter. n entspricht der Zahl der untersuchten Harnproben. In diesem Fall 143. Die übrigen Symbole sind bereits oben erklärt.

Für a ergab sich 0,01369
für b ergab sich 5,08619.

Für jedes beliebige biologische Meßergebnis x aus den 143 untersuchten Harnproben kann nun nach folgender Beziehung:

$$y' = a + b \cdot x$$

der dem biologischen Wert x entsprechende Wert y' errechnet werden, welcher auf der Regressionsgeraden liegt, und mit dem ihm entsprechenden spektrophotometrischen Meßergebnis y identisch wäre, wenn mit beiden Methoden absolut fehlerfrei gemessen worden wäre. Wird zu zwei biologischen Werten x der zugehörige Wert y' errechnet, so ist die Regressionsgerade graphisch darstellbar.



Streuungsdiagramm von biologischer und spektrophotometrischer Methode mit der dazugehörigen, errechneten Regressionsgeraden.

Um weitere Aussagen über die Zuverlässigkeit der Meßergebnisse der spektrophotometrischen Methode zu gewinnen, wurden bei vier Harnproben mit unterschiedlicher Kallikreinkonzentration Zehnfachbestimmungen durchgeführt.

Aus jeder dieser Reihe wurde das arithmetische Mittel

$$\bar{x} = \frac{\Sigma\, x_i}{n}$$

gebildet, wobei n in diesem Falle 10 ist.

Ferner wurde um die Streuung der Einzelwerte x_i um den Mittelwert $\bar{x}$ feststellen zu können, die mittlere quadratische Abweichung $\sigma\, x_i$ nach der folgenden Formel berechnet:

$$\sigma\, x_i = \sqrt{\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Damit konnte bestimmt werden, in welchem Bereich um den Mittelwert $(\bar{x} \pm \sigma\, x_i)$ etwa 68,3 % der Einzelwerte liegen. Im Bereich um den Mittelwert $(\bar{x} \pm 2\, \sigma\, x_i)$ liegen etwa 95,5 % aller Einzelwerte.

Der Mittelwert $\bar{x}$ ist nur einer von vielen möglichen Mittelwerten $\bar{x}_i$, die wiederum annähernd der Gaußschen Normalverteilung folgen. Daraus ergibt sich, daß sich der wahre Mittelwert mit etwa 95,5 % Wahrscheinlichkeit im Bereich $(\bar{x} \pm 2\, \sigma\, \bar{x})$ bewegt, wobei $\sigma\, \bar{x}$ nach folgender Beziehung erhalten wird:

$$\sigma\, \bar{x} = \frac{\sigma\, x_i}{\sqrt{n}}$$

Der Variationskoeffizient V erlaubt den Vergleich zwischen Reihen mit sowohl unterschiedlichen Mittelwerten, als auch unterschiedlicher Streuung durch die Relativierung auf 100. Er wird nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{\sigma \, x_i \cdot 100}{\sqrt{n}} \%$$

D. h. es wird die Streuung der Einzelwerte in Prozent vom Mittelwert errechnet.

Bei dieser Untersuchung ist die Meßreihe mit dem kleinsten Variationskoeffizienten die genaueste.

Zehnfachbestimmung bei vier Harnproben mit abnehmender Kallikreinaktivität:

I	II	III	IV
mU/ml	mU/ml	mU/ml	mU/ml
6,35	3,06	1,252	0,463
6,09	2,91	1,189	0,401
6,32	2,98	1,123	0,463
6,29	2,88	1,189	0,463
6,55	2,78	1,195	0,463
6,32	2,84	1,228	0,401
6,48	3,06	1,252	0,401
6,09	2,99	1,162	0,401
6,29	3,09	1,195	0,463
6,61	2,92	1,195	0,463

	I	II	III	IV
Arithmetisches Mittel $\bar{x}$ =	6,339 mU/ml	2,951 mU/ml	1,198 mU/ml	0,4382 mU/ml
Mittlere quadratische Abweichung σx_i =	0,172	0,103	0,039	0,032
Damit liegen etwa 68,3 % der zu erwartenden Ergebnisse zwischen	6,167	2,848	1,159	0,4062
und	6,511 mU/ml	3,054 mU/ml	1,237 mU/ml	0,4702 mU/ml
$2\sigma x_i$ =	0,344	0,206	0,078	0,064
Damit liegen etwa 95,5 % der zu erwartenden Ergebnisse zwischen	6,005	2,745	1,174	0,3742
und	6,683 mU/ml	3,157 mU/ml	1,222 mU/ml	0,5022 mU/ml
$\sigma \bar{x}$ =	0,054	0,033	0,012	0,010
$2\sigma \bar{x}$ =	0,108	0,066	0,024	0,020
Damit liegen etwa 95,5 % der zu erwartenden Mittelwerte zwischen	6,231	2,885	1,174	0,4182
und	6,447 mU/ml	3,017 mU/ml	1,222 mU/ml	0,4582 mU/ml
Variationskoeffizient V =	2,7 %	3,5 %	3,3 %	7,3 %

II. Schematische Arbeitsanleitung

In der folgenden schematischen Arbeitsanleitung wird die modifizierte Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen beschrieben. Aufgeführt sind alle erforderlichen Reagenzien, die einzelnen Arbeitsgänge, sowie die Formel zur Berechnung der Meßergebnisse.

Spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen

REAGENZIEN

ADH Alkoholdehydrogenase
Kristallsuspension
(Boehringer, Mannheim)

BAEE N$^{\alpha}$ Benzoyl – argininäthyl = ester – hydrochlorid
(Merck)

NAD^{+} Nicotinamid – adenin – dinucleotid
(freie Säure)
(Boehringer, Mannheim)
20mg/ml H_2O bidest.
2 Tage haltbar

TRASYLOL® Kallikrein – Inhibitor
(Bayer)
100 000 KIE/10ml Ampulle

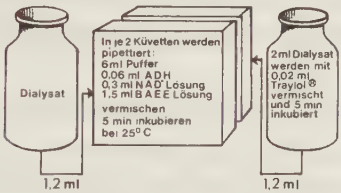
PYROPHOSPHATPUFFER
Herstellung:
15,2 g Natrium – Pyrophosphat
(Merck)
4,1 g Semicarbacid
(Merck)
0,9g Glycin
(Merck)
in 500 ml H_2O bidest. lösen
mit konz. NaOH auf pH 8,7 einstellen
14 Tage haltbar

MESSVORBEREITUNG

Dialysieren:
10 ml Harn werden in einem Cellophan-Dialysierschlauch (Kalle AG, Trockenflachbreite ca. 25mm, Länge konstant 15cm) 8-12h in min = destens 1l H_2O dest. unter Rühren dialysiert. Anschließend Volumen nach Dialyse = Vol.n.D. im Meßzylinder bestimmen.
Klarzentrifugieren bei 5000 – 7000 U/min.

MESSVORGANG: bei Hg 366 nm und 25°C

Schichtlänge der Küvetten: 4 cm



1,2 ml — in Küvette I pipettieren vermischen

1,2 ml — in Küvette II pipettieren vermischen

nach weiteren 2 min Inkubationszeit

Extinktion bei t = 0 min — Extinktion bei t = 0 min
" " t = 10 min — " " t = 10 min

ablesen und aus den erhaltenen Werten
ΔEM (Meßwert) und ΔEO (Leerwert)
nach der Beziehung: $[Et10 - Et0]$ errechnen

BERECHNUNG:

$$[\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1{,}01)] \cdot 5{,}72 \cdot \text{Vol.n.D} \; \Delta\left[\frac{mu}{ml}\right]$$

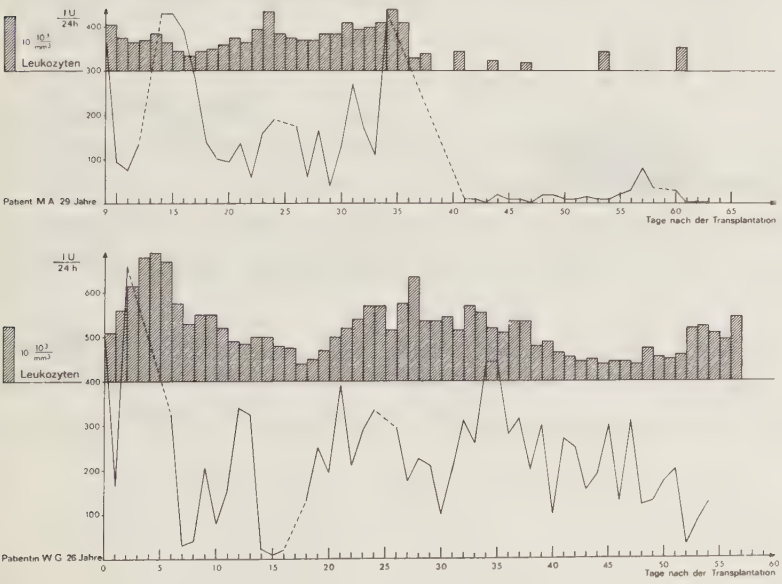
III. Besondere Beobachtungen

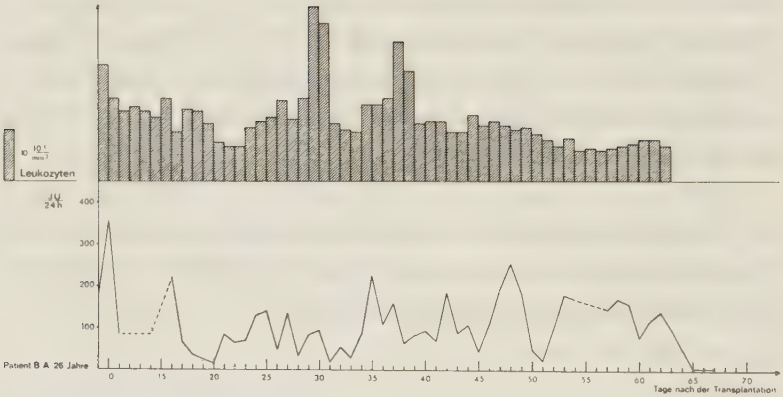
Werden spektrophotometrische Kallikreinbestimmungen ohne vorheriges Dialysieren der Harnproben durchgeführt, so zeigt sich, daß der Meßwert regelmäßig nicht der wirklichen Kallikreinaktivität entspricht, sondern daß er höherliegt. D. h., daß im Harn ein Metabolit vorhanden ist, der bei den Messungen miterfaßt wird. Dieser Beobachtung wurde nachgegangen und es ergab sich, daß es sich um eine Substanz handelt, die keine Reaktion mit BAEE eingeht, jedoch mit ADH und NAD^+, denn nach Weglassen des BAEE aus dem Reaktionsgemisch findet trotzdem dieselbe Extinktionsänderung statt. Es muß sich also um eine Substanz mit einer alkoholischen Gruppe handeln. Durch Dialysieren wird diese offensichtlich niedermolekulare Substanz schnell nahezu völlig aus der Harnprobe entfernt und sie vermag dann nicht mehr das Meßergebnis zu beeinträchtigen, zumal ja die Kallikreinaktivität durch Hemmung mittels Trasylol genau abgegrenzt werden kann gegenüber allen, die Messung beeinträchtigenden Faktoren.

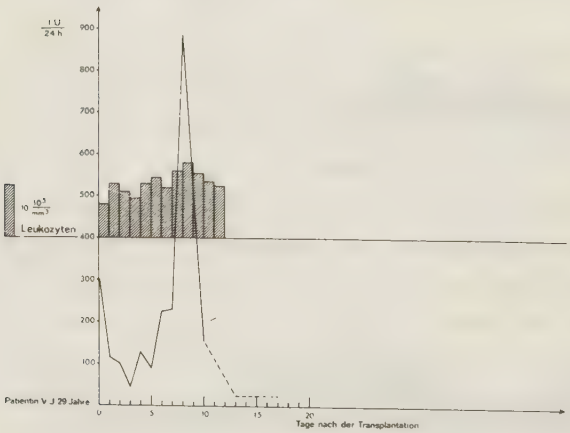
Bei der Untersuchung des Harnes von Patienten, bei denen eine Nierentransplantation durchgeführt worden war, zeigte sich, daß diese Substanz, deren Konzentration im Harn aller übrigen untersuchten Fälle stets kleiner als 10 mU/ml war, in erheblichem Maße auf Werte bis zu 170 mU/ml anstieg. Aus diesem Grunde wurde die tägliche Ausscheidung dieses Metaboliten in der Zeit nach der Transplantation bei vier Patienten beobachtet und ein Vergleich mit anderen verfügbaren Laborwerten angestellt, nämlich mit der täglichen Leukozytenzahl, der täglichen Harnstoff- und Creatininausscheidung und der Osmolalität des Harnes. Außerdem wurde die Dosierung der immunsuppressiv wirkenden Therapeutika Imuran und Prednison mit der täglichen Ausscheidung des Metaboliten verglichen. Es konnte kein Hinweis auf eine

Abhängigkeit von der Dosierung von Imuran und Prednison gefunden werden. Auch beim Vergleich mit den Werten für die Osmolalität des Harnes, die tägliche Harnstoff- und Creatininausscheidung konnte keine Beziehung zur Ausscheidung dieses Metaboliten erkannt werden. Lediglich beim Vergleich mit den Leukozytenwerten wurden Hinweise auf eine mögliche Beziehung gefunden, so fällt, wie aus nachfolgenden Diagrammen ersichtlich ist, bei dem 29jährigen Patienten M. A. die Leukozytenzahl am 36. Tag nach der Transplantation erheblich ab. Ebenso geht zu diesem Zeitpunkt die tägliche Ausscheidung des Metaboliten auf Werte zurück, wie sie bei völlig gesunden Personen gefunden werden.

Der Verlauf der Diagramme der täglichen Leukozytenwerte und der täglichen Ausscheidung des Metaboliten bei den übrigen drei Patienten weist ebenfalls auf die Möglichkeit einer Beziehung zueinander hin.




10 10³/mm³
Leukozyten
IU/24 h
400
300
200
100
Patient B. A. 26 Jahre
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Tage nach der Transplantation


IU/24 h
900
800
700
600
500
400
300
200
100
10 10³/mm³
Leukozyten
Patientin V. J. 29 Jahre
0
5
10
15
20
Tage nach der Transplantation

G DISKUSSION

Spektrophotometrische Methoden sind wie alle anderen Methoden mit Fehlermöglichkeiten behaftet. Als Ursache hierfür könnten vielerlei Faktoren genannt werden, wie das Auftreten von störenden Substanzen bei einer niedrigen Konzentration des zu analysierenden Bestandteiles im biologischen Untersuchungsmaterial. Bei der Messung von Enzymaktivitäten ergeben sich zusätzliche Probleme, da hier viele Einflußfaktoren genau standardisiert sein müssen.

Als Ziel biochemischer Analytik ist das innerhalb gewisser Grenzen richtige Ergebnis anzusehen. Dies kann aber nur erreicht werden, wenn die Fehlermöglichkeiten bekannt sind. Es können prinzipiell verschiedene Fehlertypen nach dem auf C. F. Gauss zurückgehenden Schema unterschieden werden.[5,12]

1. Grobe Fehler

Sie entstehen durch falsches Arbeiten, wie Verwechselung von Proben und Geräten. Sie sind durch Rationalisierungs- und Organisationsmaßnahmen vermeidbar.

2. Systematische Fehler

Sie bewirken, daß die Resultate einseitig vom wahren Wert nach oben oder unten abweichen, wie dies beispielsweise bei der Verwendung von verunreinigten Reagenzien auftreten kann. Sie zu erkennen und auszuschließen ist oft mit großen Schwierigkeiten verbunden, jedoch sind diese Fehler analysierbar.

3. Zufällige Fehler

Sie können grundsätzlich immer auftreten und bewirken, daß die Resultate von einander abweichen. Ihre Ursachen sind vielfach kaum zu analysieren. Zum Bei-

spiel können bei dieser Methode Einstellungsschwankungen des Photometers zu solchen Fehlern führen oder aber auch Variationen bei der Einstellung des Flüssigkeitsmeniskus an der Pipettenmarke. Um letzteren Fehler möglichst auszuschalten wurden weitgehend Marburg-Pipetten nach dem Mikrolitersystem verwendet.

Um eine Kenngröße für das Ausmaß des zufälligen Fehlers zu erhalten, erschien es als sinnvoll, bei vier Harnproben mit abnehmender Kallikreinaktivität eine Zehnfachbestimmung durchzuführen. Unter der Annahme, daß die zufälligen Fehler in diesen vier Reihen den statistischen Gesetzen einer Normalverteilung folgen, läßt sich die mittlere quadratische Abweichung σx_i als Kenngröße heranziehen, b.z.w. $2\sigma x_i$, wobei, wie bereits erwähnt, im Bereich $\bar{x} \pm \sigma x_i$ etwa 68,3 % und im Bereich $\bar{x} \pm 2\sigma x_i$ etwa 95,5 % der zu erwartenden Ergebnisse um den Mittelwert $\bar{x}$ liegen. Je kleiner die Werte für σx_i b.z.w. $2\sigma x_i$ sind, um so "präziser" sind die Meßergebnisse.
Nun hängt jedoch die Größe der mittleren quadratischen Abweichung in hohem Maße von den jeweiligen Arbeitsbedingungen ab. An verschiedenen Analysentagen können sich unterschiedliche Werte ergeben, ebenso in verschiedenen Laboratorien.

Es ist eine allgemeine biologische Erfahrung, daß eine Vergrößerung der Meßwerte auch eine größere "Gestreutheit" bedingt, wie es sich auch hier zeigte.

Bei der Zehnfachbestimmung der vier Harnproben mit einem Kallikreingehalt von:

6,34	mU/ml	ergab	sich	für	σx_i :	0,172
2,95	"	"	"	"	"	0,103
1,20	"	"	"	"	"	0,039
0,44	"	"	"	"	"	0,032

Bei oberflächlicher Betrachtung könnte aus diesen Werten geschlossen werden, daß mit dieser Methode bei einer niedrigen Kallikreinaktivität genauere Meßergebnisse erhalten werden. Dies ist jedoch nicht richtig, denn die Werte für σx_i müssen in Relation zur Kallikreinaktivität im Harn gesehen werden. Es erscheint daher zu Vergleichszwecken als günstiger mit dem Begriff des Variationskoeffizienten zu arbeiten, da bei ihm die Streuung der Einzelwerte in Prozent vom Mittelwert errechnet wird. Auf diese Weise lassen sich Werte erhalten, die sowohl den Vergleich zwischen unterschiedlichen Reihen zulassen, als auch eine Aussage über die Zuverlässigkeit im Vergleich zu anderen in der klinischen Chemie verwendeten Methoden. Bei der Zehnfachbestimmung der vier Harne mit einer Kallikreinaktivität von:

6,34	mU/ml	ergab	sich	ein	Variationskoeffizient	von:	2,7 %
2,95	"	"	"	"	"	"	3,5 %
1,20	"	"	"	"	"	"	3,3 %
0,44	"	"	"	"	"	"	7,3 %

Die Frage, ob die erreichte Zuverlässigkeit ausreichend ist, kann nach verschiedenen Gesichtspunkten beantwortet werden. Einmal, indem die Frage gestellt wird, welche Zuverlässigkeit nach dem heutigen Stand der analytischen Methodik erreichbar ist. Zu diesem Zweck werden in der nachfolgenden Tabelle

Angaben über die Variationskoeffizienten verschiedener klinisch-chemischer Methoden gemacht:

	Variationskoeffizienten in %		
	Anforderungen des CAP+) (= 1/16 NR)	Ergebnisse in US-University-Hospitals [24]	1. Med. Univ.-Klinik Kiel [1]
Glucose	2,5	4,1	2,5
Harnstoff	3,8	5,8	3,0
Cl	0,6	1,0	0,9
Na	0,4	1,1	1,4
K	1,4	2,5	2,0
P	3,7	4,9	3,1
Ca	1,9	2,3	3,0
Protein	1,8	2,6	1,6
Cholesterin	2,6	5,1	3,0
Bilirubin		7,6	3,7
GOT	4,1	11,8	6,0
alk. Phosphatase	5,6	10,6	7,0

+) Das College of American Pathologists hat die Forderung aufgestellt, daß der Variationskoeffizient 1/16 des klinischen Normalbereiches entsprechen sollte.

Beim Vergleich mit den in dieser Tabelle aufgeführten Variationskoeffizienten zeigt sich, daß die Zuverlässigkeit der Methode ausreichend ist.

Eine andere Möglichkeit Aussagen über die Zuverlässigkeit der Methode zu gewinnen, geht von der Verwendbarkeit der Analysenresultate für diagnostische Zwecke aus. Da das Meßergebnis eine Aussage erlauben soll, ob es sich um einen normalen oder pathologischen Wert handelt, muß die Präzision einer klinischen Methode der Breite des Normalbereichs adäquat sein. In diesem Sinne sind entsprechend der Forderung des American College of Pathologists (CAP)[43] die "allowable limits of error" (A. L. E.) festgelegt:[25]

$$\text{A. L. E.} = \frac{\pm \frac{1}{16} \text{ Normalwertbereich}}{\text{Mittel des Normalwertbereiches}} \cdot 100\ \%$$

Das Ergebnis für A. L. E. entspricht dem zu fordernden Variationskoeffizienten.

Da die Bestimmung der Kallikreinkonzentration im Harn bisher nur wenig zu diagnostischen Zwecken verwendet wurde, liegen bisher keine eindeutigen Angaben über den Normalwertbereich vor. Außerdem wird die Kallikreinkonzentration durch Veränderung der Diurese stark beeinflußt. Jedoch dürften Werte unter 0,05 KE/ml und über 0,7 KE/ml als nicht mehr der Norm entsprechend angesehen werden. Wird der von I. Trautschold und E. Werle[9] angegebene Umrechnungsfaktor von biologischen in enzymatische Einheiten von 8,8 zu Grunde gelegt, ergäbe sich ein Normalwertbereich von 0,44 mU/ml bis 6,16 mU/ml. D. h., für A. L. E. ergäbe sich ein Wert von $\pm$ 10,1 %. Damit entspräche die Methode auch aus dieser Sicht den Anforderungen, die heute an klinisch-chemische Methoden gestellt werden, zumal in der oben angegebenen Formel zur Berechnung von A. L. E. bereits $\frac{1}{4}$ des Normalwertbereiches in der Literatur als ausreichend angesehen wird.[5]

Es muß darauf hingewiesen werden, bei welchen Arbeitsgängen systematische Fehler in besonderem Maße auftreten, und wie sie standardisiert werden können.

Beim Bestimmen des Volumens nach der Dialyse bleibt im Dialysierbeutel immer ein kleiner Rest Dialysat zurück. Als Dialysierschlauch soll daher immer derselbe Typ mit gleichbleibender Trockenflachbreite und konstanter Länge verwendet werden. Weitere systematische, sowie zufällige Fehler können bei der Pufferherstellung und bei der Einwaage der Reagentien NAD^+ und BAEE auftreten. Diese könnten vermindert werden, wenn die Methode im Sinne einer Testpackung Anwendung finden würde.

Fehler können jedoch nicht nur innerhalb der Methode, sondern auch außerhalb, z. B. beim Sammeln des 24 h-Urines auftreten. Sie führen zwangsläufig zu falschen Ergebnissen bei der Errechnung der Kallikreintagesausscheidung, deren Kenntnis für diagnostische Zwecke wie bereits erwähnt von besonderer Bedeutung ist.

Von weiterer größter Wichtigkeit ist die Spezifität einer klinischen Methode. Da die enzymatische Aktivität des Kallikreins abgegrenzt wird gegenüber allen die Messung störenden Faktoren durch Hemmung mittels Trasylol wäre es denkbar, daß die Methode keine Anwendung zur Bestimmung des Harnkallikreins finden könnte, wenn im Harn Trypsin, Chymotrypsin oder Plasmin vorkämen, welche ebenfalls BAEE spalten und von Trasylol gehemmt werden[32]. Diese Frage konnte nur experimentell geklärt werden, weil in der Literatur keine Anhaltspunkte über das Vorkommen dieser Enzyme im Harn gefunden wurden. Da sich bei 143 Harnproben aus einem breiten Patientengut im Doppelblind-

versuch eine hoch positive Korrelation mit der biologischen Methode ergab, darf mit Recht angenommen werden, daß im Harn die genannten Enzyme nicht vorkommen, und die Methode damit als spezifisch für Kallikrein anzusehen ist.

Die Empfindlichkeit der Methode ist wesentlich abhängig von der Ablesegenauigkeit an der Meßskala des Photometers, wobei allerdings bei Abnahme der Kallikreinaktivität im Harn mit einer erheblichen Zunahme des Variationskoeffizienten zu rechnen ist. Da die Einteilung der Meßskala des Photometers logarithmisch ist, müssen die Extinktionen stets im ersten Drittel der Meßskala abgelesen werden, wobei die Differenz zwischen Meßwert und Leerwert dann auf zwei Skalenteile genau abgelesen werden kann. Daraus ergibt sich, daß bei einer Messung bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm eine Kallikreinkonzentration von etwa 0,114 mU/ml noch erfaßt werden kann und entsprechend bei einer Wellenlänge von Hg 344 nm eine Konzentration von etwa 0,0625 mU/ml.

Die Vorteile der Methode sind darin zu sehen, daß sie im Gegensatz zur biologischen in jedem klinisch-chemischen Labor durchgeführt werden kann. Vor allem werden keine anderen blutdruckaktiven Substanzen, wie Renin und Histamin miterfaßt.

Ein Nachteil ist darin zu sehen, daß die Methode nur in geringem Maße durch Verwendung eines Enzymtestauswerters in Verbindung mit einem Küvettenwechselautomaten automatisiert werden kann, da jedes Dialysat eine unterschiedliche Eigenfarbe aufweist und daher meist für jedes Küvettenpaar eine andere Transformationsstufe am Photometer von Hand eingestellt werden muß. Eine Automation durch Verwendung eines sog. Autoanalyzers dürfte daher nur schwer

möglich sein. Außerdem darf die Methode wegen der Verwendung von Alkoholdehydrogenase nicht in einer Umgebung durchgeführt werden, in der gleichzeitig mit alkoholischen Lösungen gearbeitet wird.

Die Methode sollte nicht kritiklos dazu verwendet werden, tierische Harne auf ihre Kallikreinaktivität zu untersuchen, da hier die Frage der Spezifität nicht geklärt ist.

Die Bedeutung einer spektrophotometrischen Methode zur Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen liegt in der Früherkennung von solchen Nierenfunktionszuständen, die mit einer Schädigung des tubulären Apparates einhergehen, wie dies vorkommt bei:[4]

Abstoßungskrisen nach Nierentransplantationen

Nephropathia e graviditate

Nephritis und Nephrose

Diabetes mellitus mit tubulärer Schädigung

Myeloischer Leukämie und

akuter tubulärer Nekrose nach Verbrennungen.

H ZUSAMMENFASSUNG

Die spektrophotometrische Methode von I. Trautschold und E. Werle zur Bestimmung reiner Kallikreinlösungen wurde modifiziert und so erreicht, daß trotz störender Faktoren im menschlichen Harn und seines verhältnismäßig niedrigen Kallikreingehaltes exakte Harnkallikreinbestimmungen durchgeführt werden können.

Anhand eines breiten Patientengutes konnte die Spezifität der Methode nachgewiesen werden. Durch Überprüfung der Methode nach statistischen Gesichtspunkten und Vergleich mit anderen gebräuchlichen, klinisch-chemischen Methoden wurde gezeigt, daß die Methode nach dem heutigen Standard zu ausreichend zuverlässigen Resultaten führt. Sie entspricht den Forderungen des American College of Pathologists.

Eine Einführung dieser Methode in die Klinik ermöglicht es, die tägliche Harnkallikreinausscheidung als Parameter für diagnostische Überlegungen zu verwenden.

LITERATUR

1 Belk, W. P. und F. W. Sundermann, Amer. J. Clin. Pathol. 17, 853 (1947)

2 Boyland, E., D. M. Wallace, D. C. Williams:
Activity of enzymes sulfatase and ß-glucuronidase in urine, serum and bladder tissue. Brit. J. Cancer 9, 62 (1955)

3 Boyland, E., D. M. Wallace, D. C. Williams:
Urinary enzymes in bladder cancer. Brit. J. Urol. 27, 11 (1955)

4 Brockstedt, J., Dissertation, Med. Fakultät München 1970

5 Büttner, H., E. Hansert und D. Stamm:
Auswertung, Kontrolle und Beurteilung von Meßergebnissen. Aus H. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstraße 1970, Bd. I

6 Forell, M. M.: Gastroenterologia (Basel) 84, 225 (1955)

7 Forell, M. M.: Schweiz. med. Wschr. 87, 828 (1957)

8 Frey, E. K., H. Kraut und E. Werle:
Kallikrein (Padutin), F. Enke, Stuttgart 1950

9 Frey, E. K., H. Kraut, E. Werle, R. Vogel, G. Zickgraf-Rüdel und I. Trautschold:
Das Kallikrein - Kinin - System und seine Inhibitoren.
F. Enke, Stuttgart 1968

10 Fritz, H., I. Trautschold und E. Werle:
Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965)

11 Habermann, E. und W. Klett: Biochem. Z. 346, 133 (1966)

12 Henkel, E.: Qualitätskontrolle im klinisch-chemischen Laboratorium.
Der Krankenhausarzt 9 (1970)

13 Kagen, L. J.: Brit. J. exp. Path. 45, 604 (1964)

14 Kellerer, H.: Theorie und Technik des Stichprobenverfahrens.
Deutsche Statistische Gesellschaft, S. 40 - 42, München (1953)

15 Koranyi, A., T. Szennes und B. G. Hatz: Dtsch. med. Wschr. 62, 55 (1937)

16 Kraut, H., E. K. Frey und E. Werle: Z. physiol. Chem. 189, 97 (1930)

17 Kraut, H. E. K. Frey, E. Werle und F. Schultz: Z. physiol. Chem. 230, 259 (1934)

18 Melmon, K. L., W. Lovenberg und A. Sjoerdsma: Clin. Chim. Acta 12, 292 (1965)

19 Moriya, H., J. V. Pierce und M. E. Webster: Ann. N. Y. Acad. Sc. 104, 172 (1963)

20 Moriya, H., K. Yamazaki und H. Fukushima: J. Biochem. (Tokyo) 58, 201 (1965)

21 Oates, J. A., K. Melmon, A. Sjoerdsma, L. Gillespie und D. T. Mason: Lancet 1964/I, 514

22 O. Roder, Dissertation, Med. Fakultät, München 1967

23 Schneider, G.: Aufgabensammlung zur statistischen Methodenlehre, Seminar für Statistik und Versicherungswissenschaft der Universität München, S. 108 - 111, München 1954

24 Straumfford, J. V. und B. E. Copeland, Amer. J. clin. Pathol. 44, 252 (1965)

25 Tonks, D. B.: Clin. Chem. 2, 296 (1956)

26 Trautschold, I.: Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät München, 1965

27 Trautschold, I., H. Fritz und E. Werle: in: E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri (Eds.): Hypotensive Peptides. Springer, New York 1966, S. 221

28 Trautschold, I., E. Werle: Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren. Hoppe-Seylers Zschr. f. physiol. Chem. S. 48 (1961)

29 Trautschold, I., H. Fritz und E. Werle: in: E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri (Eds.): Hypotensive Peptides. Springer, New York 1966, S. 221.

30 Webster, M. E., E. W. Emmart, W. A. Turner, H. Moriya und J. V. Pierce: Biochem. Pharmacol. 12, 511 (1963)

31 Werle, E.: Biochem. Z. 269, 415 (1934)

32 Werle, E.: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie. Bd. III, S. 49, Schattauer, Stuttgart 1969

33 Werle, E., M. M. Forell und L. Maier: Arch. exper. Path. Pharmakol. 225, 369 (1955)

34 Werle, E., R. Busse, A. Schmal: Klin. Wschr. 46, 1315 (1968)

35 Werle, E., R. Busse, A. Schmal: Z. ges. exp. Med. 148, 168 - 172 (1968)

36 Werle, E. und P. von Roden: Biochem. Z. 286, 213 (1936)

37 Werle, E.: in: M. Schachter: Polypeptides which affect Smooth Muscles and Blood Vessels. Pergamon Press 1960, S. 199

38 Werle, E. und I. Trautschold: Ann. N. Y. Acad. Sc. 104, 117 (1963)

39 Werle, E., I. Trautschold und H. Schievelbein: Klin. Wschr. 44, 656 (1966)

40 Werle, E. und R. Vogel: Arch. int. Pharmacodyn. 126, 171 (1960)

41 Werle, E., R. Vogel und J. Lenrodt: Arch. int. Pharmacodyn. 126, 187 (1960)

42 Wilkinson, J. H.: Diagnostic Significance of Enzyme Determinations in Urine. In: Enzymes in Urine and Kidney. Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart, S. 207 (1968)

43 Revised Quality Control Manual, developed by the Council on clinical Chemistry of the American Society of Clinical Pathologists, Chicago (1962)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle bin ich für die Themastellung, sowie für seine große Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.

Mein Dank gebührt ferner:
Herrn Prof. Dr. H. Pichlmaier für die Überlassung der Krankengeschichten.
Herrn Dr. Kh. R. Koczorek für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, sowie die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.
Herrn A. Schmal für seine große Hilfe und seine wichtigen Ratschläge.

Lebenslauf

Am 21. 12. 1944 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Theodor Heutelbach und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Riederich, in Bad Wiessee geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Taufkirchen/Vils.
1955 trat ich in das Ludwigs-Gymnasium in München ein.
1957 wechselte ich in das Wittelsbacher Gymnasium in München über, an dem ich 1964 das Abitur bestand.

Im W.S. 1964/65 begann ich mit dem Medizinstudium in München. Das Medizinische Staatsexamen bestand ich am 18. 2. 1971 in München.

Seit dem W.S. 69/70 studiere ich in München Zahnmedizin und befinde mich zur Zeit im 2. klinischen Semester.
Es ist mein Berufsziel Arzt für Mund- und Kieferchirurgie zu werden.